

ДЕТЕКЦИЯ МУТАЦИЙ В 11 ЭКЗОНЕ ГЕНА DPC4 (SMAD4) У ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ РАКОМ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ХРОНИЧЕСКИМ ПАНКРЕАТИТОМ

Е.М. ШПАДАРУК

*Международный государственный экологический университет имени А.Д. Сахарова
г. Минск Республика Беларусь*

Введение. Рак поджелудочной железы чрезвычайно агрессивное заболевание с тяжелыми осложнениями. На момент установления диагноза 55–75% больных РПЖ имеют нерезектабельные опухоли. Летальность от РПЖ выходит на пятое место среди причин смертности от рака других локализаций [1].

До настоящего времени не удалось добиться улучшения в диагностике и снижении смертности от рака поджелудочной железы в отличие от других нозологических форм злокачественных ново-

образований. В связи с этим рак поджелудочной железы остается заболеванием с крайне низкой выживаемостью и неблагоприятным прогнозом.

Прогрессирование злокачественных новообразований является серьезной проблемой онкологии – около 35 % первичных онкологических пациентов в 2010 году поступили в клиники Беларуси с распространенным опухолевым процессом [2]. Степень злокачественности опухоли и распространенность опухолевого процесса имеют большое значение для правильного выбора тактики лечения пациентов онкологического профиля. Так как возможность окончательно стабилизировать опухолевый процесс зачастую появляется только после оперативного вмешательства. В последнее время учеными проводятся активные поиски информативных малоинвазивных лабораторных тестов, которые были бы полезны в оценке распространенности и злокачественного потенциала опухоли на дооперационном этапе [3, 4, 5].

Для повышения эффективности диагностики и лечения необходимо более глубокое понимание патофизиологических изменений, которые происходят на молекулярном уровне при раке поджелудочной железы [6].

В последние 5 лет достигнут существенный прогресс в раскрытии канцерогенеза РПЖ [7, 8, 9]. Известны по крайней мере 4 гена (K-ras, p16, p53 и DPC4), ответственных за развитие опухоли поджелудочной железы.

Ген Smad4 (DPC4) впервые был идентифицирован как ген-супрессор опухолевого роста при раке поджелудочной железы и обозначен как DPC4 (homozygously deleted in pancreatic carcinoma) [10]. Ген Smad4 располагается на длинном плече (g) 18 хромосомы и состоит из 11 экзонов и 552 кодирующих аминокислот. Длинное плечо 18-й хромосомы рассматривается как наиболее частое и специфичное место хромосомных нарушений при раке поджелудочной железы [11].

Белок гена Smad4 – принадлежит к семейству Darfwin family белков и содержит два домена (амино- и карбоксил) известных как MH1 и MH2 соответственно. Этот белок является критическим компонентом сигнального пути от трансформирующего фактора роста (TGFb) и негативно регулирующего рост эпителиальных клеток. Сигнал от трансформирующего фактора роста передается при помощи двух рецепторов – рецепторы I и II типов соответственно, которые обладают серин/треонинкиназной активностью. После связывания лиганда (TGFb) с рецептором II типа (TGFbRII) этот рецептор в свою очередь активирует TGFbRI-рецептор путем фосфорилирования. TGFbRI в свою очередь фосфорилирует внутриклеточные белки Smad2 или Smad3. Фосфорилированные белки Smad2 или Smad3 формируют гетеро-олигомерный комплекс с белком Smad4. В результате образовавшийся комплекс передает сигнал непосредственно в ядро клетки. Белковый комплекс взаимодействует с ДНК прямо или косвенно через другие ДНК-связывающие белки, регулируя транскрипцию генов-мишеней и, таким образом, приводя к регулированию клеточной пролиферации [12].

Мутационные нарушения в гене Smad4 при раке поджелудочной железы были продемонстрированы в период с 1996 по 2000 года. DPC4 инактивирован в 50–90% наблюдений при раке поджелудочной железы. Потеря функции гена у 30% пациентов связана с гомозиготными делециями, в 20% – потерей гетерозиготности в комбинации с внутренней мутацией второго аллеля. Мутации включали в себя миссенс, нонсенс мутации, а также мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания и локализующиеся преимущественно в MH2 регионе. В общей сложности в 55% случаев рака поджелудочной железы инактивирован ген Smad4 [13].

Мутация гена DPC4 диагностируется в относительно поздних стадиях РПЖ, а экспрессия гена рассматривается в качестве прогностического маркера при этом заболевании. В отдельных исследованиях показано, что сниженная экспрессия выявлялась значительно чаще при низкодифференцированных аденокарциномах, чем при высоко- и умеренно дифференцированных опухолях. Пациенты с интактным геном имели лучшую выживаемость после панкреатодуоденальной резекции, чем при мутированном гене – 19,2 и 14,7 мес. соответственно. При изучении нарушений в гене DPC4 у пациентов с хроническим панкреатитом имеются отдельные данные, указывающие на наличие мутации при неопухолевой патологии заболеваний поджелудочной железы [14].

Цель исследования – оценить значимость делеций в 508 и 513 кодонах 11 экзона гена DPC4 для диагностики раннего развития рецидива заболевания после радикального хирургического лечения при раке поджелудочной железы хроническом панкреатите.

Методика и объекты исследования. В основу работы положены данные исследования 70 пациентов, страдающих раком поджелудочной железы, и 13 пациентов с хроническим панкреатитом, находившихся на лечении в РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова в 2005–2012 гг.

Мутации в 11 экзоне гена DPC4/Smad4 выявляли методом полимеразной цепной реакции с последующим секвенированием. Выделение ДНК из опухолевой ткани проводилось с использованием набора «QIAamp DNA FFPE Tissue» («Qiagen», Германия). Детекция результатов осуществлялась на генетическом анализаторе ABI 3130 (США).

Пациенты, страдающие раком поджелудочной железы, включались в исследование с обязательным морфологическим подтверждением диагноза.

Результаты и их обсуждение. В зависимости от морфотипа рака поджелудочной железы пациенты были распределены следующим образом. Протоковая аденокарцинома верифицирована у 43 (61%) пациентов, муцинозная аденокарцинома обнаружена в 10 (14%) случаях, метастатическая аденокарцинома – в 5 (7%). Количество пациентов с выявленной смешанной протоково–эндокринной карциномой составило 4,5%, высокодифференцированная нейроэндокринная карцинома (карциноид) диагностирована у 4 (6,5%) пациентов, умеренно дифференцированная карцинома (атипичный карциноид) – у 1 (1,4%), протоковая аденокарцинома с очаговым саркоматоидным строением также верифицирована у 1 (1,4%) пациента. У 5 (7%) пациентов верифицирована метастатическая аденокарцинома. Недифференцированный (анапластический рак), светлоклеточная аденокарцинома и аденокарцинома кишечного типа выявлены в единичных случаях, что составило 1,4%.

Возраст пациентов, включенных в исследование, варьировал от 39 до 82 лет. Средний возраст составил $61,4 \pm 11,3$ года. Наиболее многочисленной оказалась группа пациентов (30%) в возрасте от 61 до 70 лет.

В общей анализируемой группе пациентов РПЖ преобладала аденокарцинома со степенью дифференцировки G2 (70%). Количество пациентов с высокой степенью дифференцировки опухоли G1 составило 16%, с низкой степенью дифференцировки G3 – 14%.

При анализе степени распространенности опухолевого процесса в анализируемой группе пациентов РПЖ преобладали IV и II ст. стадии опухолевого процесса – по 44,3% соответственно. Количество пациентов с раком поджелудочной железы I ст. составило 4,3%, III ст. – 7,1%. Распределение пациентов по степени распространенности злокачественного процесса представлено на рисунке 1.

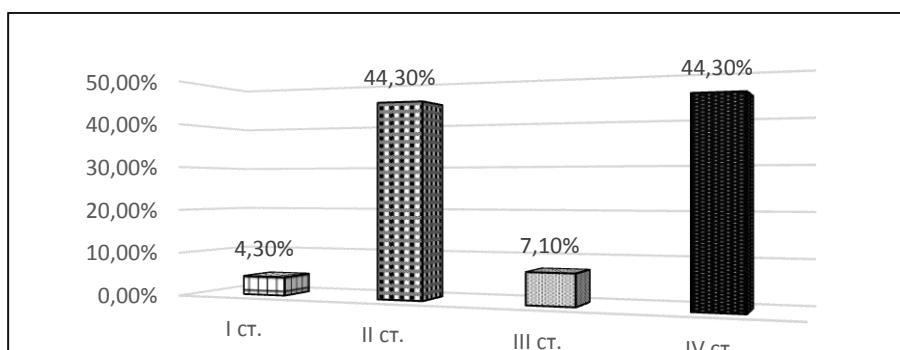


Рисунок 1 – Характеристика пациентов РПЖ по степени распространенности опухолевого процесса

Объем операции определялся с учетом степени распространенности опухолевого процесса. Радикальная резекция поджелудочной железы проведена 27 (39%) пациентам, паллиативное оперативное вмешательство произведено 33 (47%) пациентам. Лучевая терапия проведена 16 (23%), химиотерапия выполнена 12 (17%) пациентам.

В исследование включены 13 пациентов хроническим панкреатитом. В общей анализируемой группе пациентов преобладал хронический индуративный (фиброзно–склеротический) панкреатит. Данный вид панкреатита отмечен у 6 (46%) пациентов. У пациентов с панкреатитом возраст колебался в пределах от 39 до 66 лет. Средний возраст составил $53 \pm 10,3$.

Оценку результатов секвенирования 11 экзона гена DPC4 (Smad4) 63 пациентам раком поджелудочной железы и 13 пациентам хроническим панкреатитом проводили с использованием специального программного обеспечения «BLAST» (рисунок 2). На рисунке 2 приведена электрофореграмма гена DPC4 с мутацией в 513 кодоне у пациента раком поджелудочной железы, которая характеризуется выпадением нуклеотидного основания аденина в последовательности TACC > TCC, что приводит к активации процессов пролиферации и раннему развитию рецидива заболевания у пациента раком поджелудочной железы.

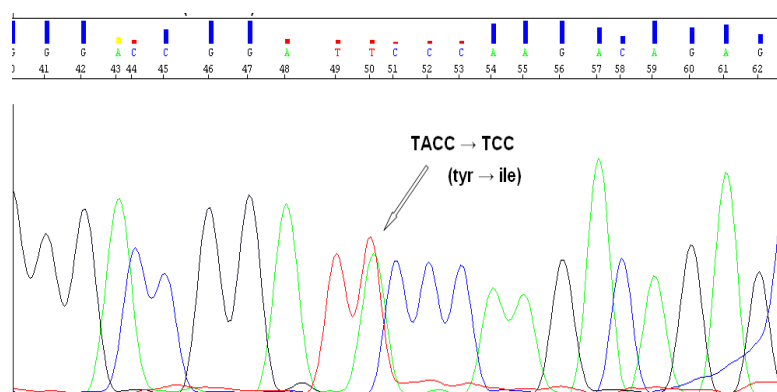


Рисунок 2 – Фрагмент электрофореграммы 11 экзона гена DPC4 (делеция TACC > TCC; Ter > Ile, кодон 513)

У 12 (19%) пациентов с раком поджелудочной железы и у 2 (15%) пациентов с хроническим панкреатитом были выявлены различные генетические нарушения в 11 экзоне гена DPC4 (Smad4). Среди выявленных генетических нарушений преобладали делеции (G~~A~~AA > GAA; Gly > Ala; T~~A~~CC > TCC; Ter > Ser) в 508 и в 513 кодонах соответственно. У пациентов раком поджелудочной железы делеции в 513 кодоне детектированы у 9 (14,3%) пациентов, в 508 кодоне у 3 (4,8%). Среди пациентов с хроническим панкреатитом у одного выявлена мутация в 508 кодоне и одного мутация в 513 (таблица).

Таблица – Распределение пациентов с РПЖ и хроническим панкреатитом в зависимости от наличия мутаций в гене DPC4

	Количество пациентов с делециями в 513 кодоне, абс. число (%)	Количество пациентов с мутацией в 508 кодоне, абс. число (%)
РПЖ	9 (14,3%)	3 (4,8%)
Хронический панкреатит	1 (7,7%)	1 (7,7%)

На рисунке 3 приведены результаты исследований по выявлению мутаций в 11 экзоне гена DPC4 (Smad4) у пациентов с раком поджелудочной железы.

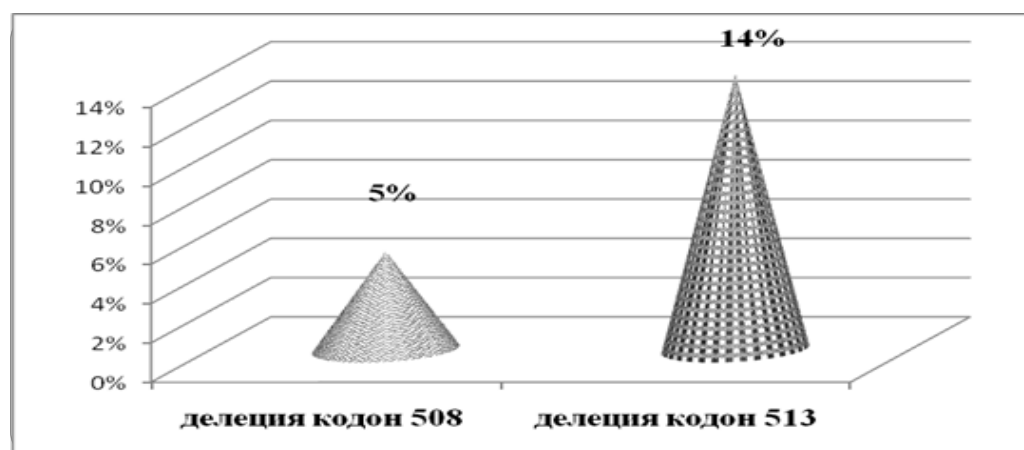


Рисунок 3 – Частота выявления мутаций в 11 экзоне гена DPC4 (Smad4) у пациентов с раком поджелудочной железы

В зависимости от стадии опухолевого процесса распределение пациентов было следующим (рисунок 4): мутация в 11 экзоне гена DPC4 (SMAD4) у пациентов со II ст. опухолевого процесса отмечена у 6 пациентов, что составило (9,5%); с III ст. – у 5 (7,9%) и с IV ст. – у 1 (1,6%). Это свидетельствует о том, что даже на ранних стадиях заболевания диагностируются мутации в 11 экзоне гена DPC4 (Smad4) у пациентов с раком поджелудочной железы.

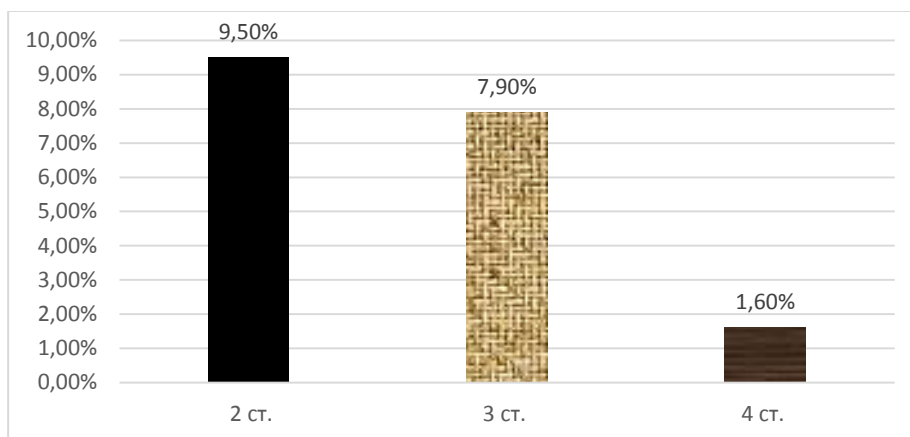


Рисунок 4 – Частота выявления мутаций в 11 экзоне гена DPC4 (Smad4) у пациентов с раком поджелудочной железы в зависимости от стадии опухолевого процесса

На основании полученных данных можно предположить, что возникновение мутаций в соматических клетках может отражать явление повышенной генетической нестабильности. Кроме этого, результаты проведенных исследований показывают, что мутации в гене DPC4 (Smad4) могут присутствовать уже в доброкачественных тканях, таких как хронический панкреатит, что увеличивает вероятность трансформации в аденокарциному.

Молекулярно-генетический анализ показал, что выявление генетических нарушений (G~~A~~AA > GAA; Gly > Ala; T~~A~~CC > TCC; Ter > Ser) в 508 и в 513 кодонах гена DPC4 у пациентов, страдающих раком поджелудочной железы, сопряжено с высоким риском раннего развития рецидива заболевания (в первые 6–8 мес.) после радикального лечения по отношению к пациентам, не имеющим делеций в данном гене. У 83,3% пациентов с мутацией детектирован ранний рецидив заболевания. Получены статистически значимые различия в бессобытийной выживаемости пациентов раком поджелудочной железы при наличии мутации в изучаемом гене и генерализации опухолевого процесса по отношению к группе пациентов без мутации гена (U, $p_{\text{Манна-Уитни}} < 0,05$). 75% пациентов, страдающих РПЖ, с мутацией в 11 экзоне гена DPC4 (Smad4) имело неблагоприятный прогноз течения болезни и умерло от основного заболевания.

Выводы. У 19% пациентов с раком поджелудочной железы и у 15% пациентов с хроническим панкреатитом были выявлены различные генетические нарушения в 11 экзоне гена DPC4 (Smad4). Ранний рецидив заболевания РПЖ отмечен у 83,3% пациентов с РПЖ.

Таким образом, молекулярно-генетическая диагностика делеций в 508 и 513 кодонах 11 экзона гена DPC4 позволяет диагностировать раннее развитие рецидива заболевания после радикального хирургического лечения и проводить индивидуальный выбор интенсифицированной адъювантной химиолучевой терапии при раке поджелудочной железы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алгоритмы диагностики и лечения больных злокачественными новообразованиями / И.Ю. Аверкин [и др.]; под общ. ред. И.В. Залуцкого, Э.А. Жабрика. – Минск: Общественное объединение «Белорусское общество онкологов», 2007. – С. 162–173.
2. Злокачественные новообразования в Беларуси 2001–2010 / А. Е. Океанов [и др.]; под общ. ред. О. И. Суконко [и др.]. – Минск: РНПЦ МТ, 2011. – 221 с.
3. Pretreatment levels of serum Vascular Endothelial Growth Factor do not correlate with outcome in patients with locally advanced cervical cancer / K. Katanyool [et al.] // Asian Pacific J. Cancer Prev, – 2011. – Vol. 12. – P. 699 – 702.
4. Pretreatment serum levels of cytokines and cytokine receptors in patients with non-small cell lung cancer, and correlations with clinicopathological features and prognosis / J. Kaminska [et al.] // Oncology. – 2006. – Vol. 70. – P. 115 – 125.
5. Tissue factor, angiogenesis and tumour progression / J.E. Bluff [et al.] // Breast Cancer Res. – 2008. – Vol. 10. – P. 204–214.
6. Xu Z.-W., Friess H., Buchler M.W. Molecular of pancreatic cancer // J. of Exp. Oncol. – 2000. – № 22. – P. 8–14.
7. Горгун Ю.В. Современные представления об этиологии хронического панкреатита // Мед. панорама. – 2003. – № 2. – 64–68 с.

8. Dong M., Ma G., Tu W. [et al.] Clinicopathological significance of p53 and mdm2 protein expression in human pancreatic cancer // World J. Gastroenterol. – 2005. – Vol. 11. – P. 2162–2165.
9. Schwartz G.G. Rets J.M. Is cadmium a cause of human pancreatic cancer? // Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. – 2000. – Vol. 9, N 2. – P 139–145.
10. Dpc4 transcriptional activation and dysfunction in cancer cells / J. Le Dai [et al.] // Cancer Res. – 2005. – №58. – P. 4592–4597.
11. Molecular biological events in the development of pancreatic cancer / C.F. Frances [et al.] // The Pancreas Edited by: H.G. Begger et al. – 1998. – Chapter 97.
12. Tumor-suppressor genes in pancreatic cancer / R.H. Hruban [et al.] // J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. – 1998. – № 5. – P. 383–391.
13. Adhesion receptors in malignant transformation and dissemination of gastrointestinal tumors / M. Streit [et al.] // New Perspectives in Molecular and Clinical Management of Gastrointestinal Tumors. – 1996. – P. 440.
14. Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II trial / H.Q. Hiong [et al.] // J. Clin. Oncol – 2004 – Vol. 22. – P. 2610–2616.